

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/53	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/13016 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02768 (22) Internationales Anmeldedatum: 31. August 1999 (31.08.99) (30) Prioritätsdaten: 198 39 538.8 31. August 1998 (31.08.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: GLÜSENKAMP, Karl-Heinz [DE/DE]; Elbestrasse 10, D-45768 Marl (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MENGEDE, Christian [DE/DE]; Steinhausenstrasse 8, D-45747 Essen (DE). SEILER, Frank [DE/DE]; Nordschleswigstrasse 59, D-45259 Essen (DE). (74) Anwalt: GEHRKE, Peter, P.; Hölscherstrasse 4, D-45894 Gelsenkirchen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, DE, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD FOR PREPARING ARTIFICIAL RECEPTORS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BEREITSTELLUNG VON KÜNSTLICHEN REZEPTOREN (57) Abstract <p>The invention relates to a method for preparing artificial receptors on a polymer compound, preferably on a stabilized surface thereof, with binding sites in order to bind biologically or pharmacologically active substances by a) immobilizing template molecules that are biologically or pharmacologically active compounds on the polymer compound, b) coupling reactive functional groups to the polymer compound in order to bond ligands in physiological conditions, c) binding compounds as ligands to the reactive groups, d) preferably stabilizing adjacent compounds that are bonded to the reactive groups for chemical stabilization of the ligands on the polymer compound and e) detaching the template molecules.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung, vorzugsweise an einer stabilisierten Oberfläche derselben, mit Bindungsstellen zur Bindung von biologisch oder pharmakologisch aktiven Substanzen durch a) Immobilisierung von Templat-Molekülen, welche biologisch oder pharmakologisch wirksame Verbindungen sind, an der polymeren Verbindung; b) Koppeln von reaktiven funktionellen Gruppen an die polymere Verbindung zur Bindung von Liganden unter physiologischen Bedingungen; c) Bindung von Verbindungen als Liganden an die reaktiven Gruppen; d) vorzugsweise Stabilisierung der an den reaktiven Gruppen gebundenen benachbarten Verbindungen miteinander zur chemischen Stabilisierung der Liganden an der polymeren Verbindung und; e) Ablösen der Templat-Moleküle.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Beschreibung

Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung, vorzugsweise an einer stabilisierten Oberfläche derselben, mit Bindungsstellen zur Bindung von biologisch oder pharmakologisch aktiven Substanzen durch Template-Assisted Optimization als ein neuer Weg zur Herstellung von maßgeschneiderten Chromatografiematerialien über oder an intelligente Oberflächen.

Unsere neuen Ansätze zur Herstellung intelligenter Oberflächen bergen das Potential, sich zu sehr kostengünstige, analytische und präparative Instrumente für die Medizin, für das Bio- und Umweltmonitoring und für die Biotechnologie zu entwickeln. Es können mit Hilfe dieser Methoden kostengünstig neuartige Sensoren (künstliche Rezeptoren) hergestellt werden, die auf (in) Mikrochips (Biochips), als auch im herkömmlichen Format (Mikrotiterplatten) zum Einsatz kommen können. Auch neuartige Chromatografiematerialien können vor allem für biotechnologische Fragestellungen maßgeschneidert werden. Kulturüberstände von Bioreaktoren oder auch Aufschlüsse von Biomaterialien bestehen aus komplexen Substanzgemischen. Diese wässrigen Lösungen enthalten in vielen Fällen kommerziell wertvolle Metabolite, wie z.B. FADH_2 , NADH_2 , ATP, seltene Kohlenhydrate oder Coenzyme. Sehr häufig konzentriert man sich auf die Isolierung einer Verbindung oder Stoffgruppe während alle anderen Substanzklassen in vielen Fällen wegen fehlender Trenntechniken verworfen werden. Auch für die Isolierung von pharmazeutisch relevanten Molekülen, wie z.B. Taxol-Derivate aus Zellaufschlüssen von Eibenmaterial, sehen wir ein grosses Einsatzgebiet.

Die Nutzung von z.B. monoklonalen Antikörpern, Mikroorganismen, Enzymen, Rezeptoren als Erkennungsprinzip für Sensoren und Chromatografiematerialien ist aufgrund ungenügender Stabilität und begrenzter Verfügbarkeit sehr häufig limitiert. Darüber hinaus ist der Zeitaufwand zur Gewinnung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers oft beträchtlich und kann mehr als ein Jahr betragen. Unser Verfahren zielt auch darauf ab, Antikörper durch synthetische Rezeptoren zu ersetzen.

In der Literatur sind chemische Verfahren zur Herstellung von künstlichen Membranen bekannt, die zu molekularer Erkennung von verschiedenen organischen Molekülen,

wie z.B. DNS-Bausteine, befähigt sind. Bereits 1972 wurde von G. Wulff (G. Wulff, Angew. Chem. 1995, 107, 1958) erstmalig eine Polymerisationsmethode in Gegenwart von Templat-Molekülen entwickelt und der Begriff „Molekulares Prägen“ erschaffen. Geeignete monomere reaktive Moleküleinheiten werden mit Templaten vermischt (auch kovalent verknüpft) und eine Polymerisationsreaktion mit den entsprechenden „crosslinkern“ wird eingeleitet. Nach Auswaschen der Templat-Moleküle erhält man so Membranen oder Oberflächen, die Bindestellen (Hohlräume) für die Templat-Moleküle aufweisen. Inzwischen sind eine Vielzahl von Publikationen zu diesem Thema erschienen.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, mit welchem das Templat, welches einer biologisch oder pharmakologisch wirksamen Verbindung zumindest teilweise in Bezug auf Konformation und Konfiguration entspricht, bei Bindung des Templats an eine Polymer-Verbindung die Bindung der an die Polymer-Verbindung zu koppeln-
10 den Liganden zu steuern vermag. Zudem soll die Konfiguration und Konformation des Templats als sogenannte Negativabbildung von den an die Polymer-Verbindung gekoppelten Liganden geprägt sein, z.B. durch die Kopplung von bestimmten Liganden, deren molekulare Größe und Konformation. Zudem soll die Negativabbildung als Information über die Konformation und Konfiguration des Templats dauerhaft oder kurzzeitig als sogenanntes Kurzzeit oder Langzeitgedächtnis an der Polymer-Verbindung von den an der Polymer-Verbindung gebundenen Liganden geprägt sein. Ebenso sollen die von den Li-
15 ganden ausgebildeten Rezeptoren als Informationspeicher dienen.

Die Aufgabe wird gelöst durch den Hauptanspruch und den Nebenanspruch. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung, vorzugsweise an einer stabilisierten Oberfläche derselben,
25 mit Bindungsstellen zur Bindung von biologisch oder pharmakologisch aktiven Substanzen durch

- a) Immobilisierung von Templat-Molekülen, welche biologisch oder pharmakologisch wirksame Verbindungen sind, an der polymeren Verbindung,
- b) Koppeln von reaktiven funktionellen Gruppen an die polymere Verbindung
30 zur Bindung von Liganden unter physiologischen Bedingungen,

c) Bindung von Verbindungen als Liganden an die reaktiven Gruppen,

d) vorzugsweise Stabilisierung der an den reaktiven Gruppen gebundenen benachbarten Verbindungen miteinander zur chemischen Stabilisierung der Liganden an der polymeren Verbindung und

5 e) Ablösen der Templat-Moleküle.

Bevorzugterweise kann das erfindungsgemäße Verfahren I zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer Polymer-Verbindung zur Bindung von biologisch oder pharmakologisch aktiven Substanzen, die ein Templat sind, vorzugsweise an stabilisierten Oberflächen einer polymeren Verbindung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass

10 a) eine Polymer-Verbindung zur Aminopropylierung mit einer Chlorpropylamin gelöst in MeOH in einem Wärmeschritt, vorzugsweise in einem Mikrowellenreaktor mit 600 Watt 1 bis 4 min lang bestrahlt, bevorzugterweise weitere 4 min lang bestrahlt wird, und dann nach Waschung mit wäßriger Essigsäure und aqua bidest getrocknet wird,

b) die Polymer-Verbindung mit Aminopropyl-Gruppen zu Darstellung aktivierten Polymer-Verbindung mit einer Quadratsäureester-Verbindung und Triethylamin
15 gelöst in MeOH bei RT 1 bis 24 Stunden lang, inkubiert und nach einer Waschung mit ETOH luftgetrocknet wird,

c) die Polymer-Verbindung zur Darstellung einer Polymer-Dendrimer-Verbindung mit einem dendritischen Polymer und Triethylamin gelöst in MeOH bei RT
20 bis 24 Stunden lang inkubiert und nach einer Waschung mit EtOH luftgetrocknet,

d) die Polymer-Dendrimer-Verbindung zur Darstellung aktivierter Polymer-Dendrimer-Verbindung und quantitativer Umsetzung von Aminen in Quadratsäureester-Derivate mit einer Quadratsäureester-Verbindung und Triethylamin gelöst in MeOH bei RT 48 Stunden lang inkubiert und nach Waschung in EtOH luftgetrocknet,

25 e) die aktivierte Polymer-Dendrimer-Verbindung zur Darstellung von Cysteamin-Gruppen tragender Polymer-Dendrimer-Verbindung mit Cysteaminhydrochlorid und Triethylamin bei RT 24 Stunden inkubiert und nach einer Waschung mit EtOH luftgetrocknet,

f) die Cysteamin-Gruppen tragende Polymer-Dendrimer-Verbindung zur Darstellung von mit dem Templat verbundener Polymer-Dendrimer-Verbindung mit der Templat-Verbindung 60 min lang in Phosphatpuffer pH 6,5 bis 7,0 inkubiert,

g) dann die mit dem Templat verbundene Polymer-Dendrimer-Verbindung zur
5 Substitution noch vorhandener Quadratsäure-Gruppen an der Verbindung mit einer bicyclischen Anhydrid-Verbindung in MeOH 1 bis 10 Stunden lang inkubiert,

h) dann zur Abspaltung von N-Methylethanolamin und Aktivierung der Anhydridfunktionalitäten der Ansatz auf einen pH- Wert von 5,0 eingestellt wird,

i) dann eine Amino-Gruppen tragende Verbindung in den Ansatz zugegeben und 1
10 bis 24 Stunden lang bei pH-7,5 zur Darstellung einer Templat-abhängigen Ligandenanbindung an die anhydridfunktionelle Gruppen enthaltende mit einem Templat verbundene Polymer-Dendrimer-Verbindung inkubiert wird,

j) der Ansatz zur Fixierung der Liganden unter Imidbildung zwischen der Anhydrid-Gruppe und der Liganden auf pH-Wert 9,5 eingestellt und 10 Stunden lang stehengelassen
15 wird,

k) nach einer Waschung des Ansatzes mit aqua bidest Zugabe von Mercaptoethanol im Überschuß zur quantitativen Entfernung von Templat-Verbindungen und eine Waschung des Ansatzes mit aqua bidest.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht, dass die Immobilisierung von Templat-Molekülen mittels kovalenter Bindung oder nicht-kovalenter Bindung wie elektrostatischer Wechselwirkung z.B. Ionen-Bindung, hydrophobe Bindung oder dergleichen, an
20 der Oberfläche der polymeren Verbindung durchgeführt werden kann.

Ebenso ist es möglich, die Polymer-Dendrimer-Verbindungen bzw. deren Abkömmlinge mittels der erfindungsgemäßen Verfahren I und / oder Verfahren II zu herzustellen
25 bzw. zu modifizieren.

Hinzutretend kann das erfindungsgemäße Verfahren II zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer Polymer-Verbindung zur Bindung von biologisch oder pharmakologisch aktiven Substanzen, die ein Templat sind, vorzugsweise an stabilisierten Oberflächen einer polymeren Verbindung dadurch gekennzeichnet sein, dass

- a) die Polymer-Verbindung zur Darstellung aktivierter Polymer-Verbindung mit einer Quadratsäureester-Verbindung und Triethylamin gelöst in MeOH bei RT 1 bis 2 Stunden lang inkubiert und nach einer Waschung mit MeOH luftgetrocknet wird,
- b) die aktivierte Polymer-Verbindung zur Erhöhung der an der Polymer-
5 Verbindung gebundenen Amino-Gruppen mit Polyethylenimin in MeOH inkubiert und nach einer Waschung mit MeOH luftgetrocknet wird,
- c) dann die Polymer-Verbindung zur Darstellung hoch aktivierter Polymer-Verbindung mit einer Quadratsäureester-Verbindung und Triethylamin gelöst in MeOH bei RT 1 bis 24 Stunden lang inkubiert und nach einer Waschung mit MeOH luftgetrock-
10 net wird,
- d) die hoch aktivierte Polymer-Verbindung zur Darstellung von mit glucosamindotierter Oberfläche enthaltende Polymer-Verbindung mit Glukosamin gelöst in MeOH bei RT 2 bis 12 Stunden lang inkubiert und nach einer Waschung mit EtOH luftgetrocknet wird,
- 15 e) die mit glucosamindotierter Oberfläche enthaltende Polymer-Verbindung mit Cyclodextrin in Phosphatpuffer pH 6,5 bis 7,5 5 bis 10 min lang inkubiert, danach mit Phosphatpuffer pH 6,5 bis 7,5 gewaschen, dann
- f) die mit glucosamindotierter Oberfläche enthaltende Polymer-Verbindung zur Darstellung von Boronsäuretemplate-Polymer-Verbindung mit einer Boronsäureester-
20 Verbindung, an welche ein Templat gekoppelt ist, in Carbonat-Puffer pH 8,0 bis 9,0 5 Stunden lang inkubiert und überschüssiges Boronsäureester-Verbindung durch Waschen mit Carbonat-Puffer entfernt wird,
- g) anschließend die Boronsäuretemplate-Polymer-Verbindung zur kompetitiven Entfernung von Cyclodextrin-Schutzgruppen mit p-Toluolsulfonsäure in aqua bidest/
25 EtOH in einer Mischung von 90/10 (V/V) gewaschen wird,
- h) anschließend wird Boronsäuretemplate-Polymer-Verbindung zur Templat gesteuerten Ligandenbindung mit einer Mischung mit einer oder mehreren Verbindungen als Liganden bei pH 7,5 10 bis 24 Stunden lang bei RT inkubiert, danach mit Phosphatpuffer pH 6,5 bis 7,5 gewaschen, dann

die Boronsäuretemplat-Polymer-Liganden-Verbindung zur Darstellung Polymer-Liganden-Verbindung mit einem Bindungsort als künstlicher Rezeptor für Templat entsprechende biologisch oder pharmakologisch wirksame Verbindungen bei pH-Wert auf 4,0 bis 5,5 die Boronsäuretemplat entfernt, danach mit Citratpuffer pH 6,5 bis 7,5 gewaschen.

Bevorzugterweise können als Polymer-Verbindung Cellulosemembran, Glas, Kunststoffoberfläche, vorzugsweise Mikrotiterplatten, eine dendrimere Verbindungen, oder dendritische Polymere oder eine Lipidmembran mit OH-Gruppen verwendet werden. Als Verbindung eignen sich Aminosäuren, Nukleotide, Nukleoside bei den erfindungsgemäßen Verfahren I und II. Die Polymer-Verbindung kann eine Cellulose-Verbindung, wie ein Cellulosemembranfilter (Schleicher-Schüll), sein. Als Templat-Verbindung eignen sich jegliche kleinmolekulare Verbindungen oder hochmolekulare wie Coenzym A, Farbstoffe (siehe Ausführungsbeispiele) verwendet wird.

Es zeigt sich, daß statt Schritt a) des Verfahrens II die Polymer-Verbindung zur Aminopropylierung nach Erhitzung auf 70 – 90° C mit methanolischer Brompropylphthalimid-Lösung in Gegenwart von NaOH 60 bis 120 min lang inkubiert und dann nach Wäsche mit wäßriger Essigsäure und aqua bidest getrocknet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren soll auch ohne Zeitverlust bedingt durch das Umfüllen der durch Verfahren I und II substituierten Polymer-Verbindung in hermetisch verschlossene Gefäßen zwecks Vermeidung von Hydrolyse und Oxidation eine hinreichende Stabilisierung derselben ermöglichen, was dadurch verwirklicht wird, dass die mit Schritt b) des Verfahrens I aktivierte Polymer-Verbindung zwecks Überprüfung der Aktivität der aktivierten Polymer-Dendrimer-Verbindung 1 bis 104 Wochen bei pH 5,5 bis 6,5 ohne Cyclodextrine und gar mehr als 104 Wochen in Gegenwart von Cyclodextrin-Verbindung als Stabilisator bei RT stehen gelassen werden kann. Ebenso ist eine Lagerung der aktivierten Polymer-Dendrimer-Verbindung von bis zu 104 Wochen und mehr Wochen bei einem pH-Wert gleich oder größer 8 bis 9,0 bis 9,5 ohne Cyclodextrine ohne Auftreten von Hydrolyse der aktivierten Polymer-Dendrimer-Verbindung oder ohne deren Aktivitätsverlust möglich.

Unser neues Konzept unterscheidet sich grundlegend von dieser Vorgehensweise. Während die oben beschriebene „Imprinting-Methode“ nur irreversible Reaktionsschritte (Ausbildung der verschiedenen Bindestellen) enthält, erlaubt unser System reversible chemische Prozesse, die, im Gegensatz zur bekannten Methode, unter milden physiologischen Bedingungen ablaufen können. Es handelt sich hier also um ein „Reversibles Imprinting“. Auch werden keine reaktiven monomeren Bausteine, wie z.B. Methacrylsäure, verwendet, sondern es steht ein unerschöpflicher Pool von natürlichen oder synthetischen chemischen Verbindungen, wie z.B. Aminosäuren, Oligopeptide, Nukleotide, als potentielle Liganden zur Verfügung.

Das besondere hierbei ist, dass es sich um selbstoptimierende, supramolekulare Erkennungssysteme handelt. Die molekularen Wechselwirkungen zwischen den interagierenden Spezies sind zunächst grundsätzlich reversibel und treten in Konkurrenz zueinander. Erst durch diese essentielle Randbedingung kann sich das gesamte supramolekulare Erkennungssystem den strukturellen Gegebenheiten anpassen und sich ständig weiter verbessern. Nach einer (beliebig langen) Optimierungsphase werden dann durch einen sehr schonenden chemischen Prozess die supramolekularen Netzwerke fixiert. Auf diese Weise können höher organisierte chemische Systeme mit - vom Wissenschaftler vorgegebenen - spezifischen Erkennungseigenschaften gebildet werden.

Dieses neue Verfahren beinhaltet folgende Kernpunkte:

- Verwendung von Oberflächen als Kompartimente für die supramolekularen Systeme.
- Design und kontrollierte chemische Immobilisierung von Templat-Molekülen.
- Belegung der Oberfläche mit reaktiven funktionellen Gruppen, die reversible oder kovalente Fixierung von geeigneten Liganden unter physiologischen Bedingungen ermöglichen. Unterschiedliche Liganden müssen um eine geeignete Bindestelle konkurrieren können.
- Zugabe von monomeren oder oligomeren Bausteinen (z.B. Aminosäuren oder deren Derivate), die reversible chemische Reaktionen oder reversible supramolekulare Reaktionen mit den zuvor fixierten reaktiven funktionellen Gruppen oder Templaten eingehen können. Einstellung der Ordnungsparameter pH, Temperatur und Zeit zur optimalen

konkurrierenden Besiedlung der mit ausgewählten Templaten dotierten Oberfläche. Jetzt beginnt die Optimierungsphase zur Ausbildung der nicht-kovalenten Netzwerke zur optimalen Anordnung um die Template: Ausbildung höher organisierter Systeme. Je stärker die Interaktion zwischen den Templaten und Liganden ausgebildet wird, desto länger ist ihre Verweildauer im supramolekularen Verband. Die reversiblen chemischen Reaktionen können so gewählt werden, dass kooperative Effekte (nicht kovalente Wechselwirkungen) einen starken Einfluss auf die reaktionskinetischen Parameter ausüben können. Die Bindungs- und Abspaltungsgeschwindigkeiten der Liganden werden durch das supramolekulare Netzwerk gesteuert.

• Gegenbenenfalls eine chemische Fixierung der Liganden durch einen gezielten und schonenden chemischen Reaktionsschritt.

• Ablösung der Template durch einen weiteren chemoselektiven Schritt setzt künstliche, auf der Oberfläche verteilte Rezeptoren frei.

Das folgende Schaubild (Abbildung 1) soll zunächst schematisch und daher in sehr vereinfachter Form das neue Verfahren verdeutlichen:

Abbildung 1:

Stufe A: Gezielte Fixierung der Templat-Moleküle an der Oberfläche.

Stufe B: Zugabe unterschiedlicher Liganden, die sich unter den Inkubationsbedingungen reversibel kovalent um die Templat-Moleküle anordnen können. Diese Immobilisierungsschritte sind streng reversibel und somit wird eine wichtige Konkurrenzsituation geschaffen. Diese Stufe kann man als Optimierungsphase bezeichnen. Die hervorgehobenen Striche symbolisieren die optimierte, supramolekulare Interaktion. Je optimaler die nicht-kovalente Interaktion, desto länger ist die Verweildauer der entsprechenden Liganden an der Oberfläche. Es kann durchaus die Situation entstehen, dass eine bestehende optimale Interaktion durch die Bindung eines weiteren Liganden suboptimal wird und dieser Ligand dann durch einen anderen ersetzt werden muss, um eine stärkere Wechselwirkung im Verband zu schaffen. Hier wird deutlich, dass die Ligandenpopulation individuelle Wechselwirkungen beeinflusst oder determiniert.

Stufe C: Nach abgeschlossener Optimierung erfolgt eine chemische Stabilisierung der Liganden. Mit diesem Schritt wird der dynamische Prozess irreversibel gestaltet. Diese

chemische Fixierung des Ligandenarrangements ist eine wesentliche Vorbedingung für die Konstruktion künstlicher Rezeptoren.

Stufe D: Nach der chemischen Fixierung der Liganden werden die Template gezielt entfernt und man erhält eine Oberfläche, in der künstliche Rezeptoren eingebettet sind. Diese maßgeschneiderte Oberfläche ist als ein optimiertes Supramolekül aufzufassen, in dem einzelne Rezeptoren verteilt sind.

Bei unserem Verfahren wird eine Oberfläche als Anker für den dynamischen Imprintingprozess benutzt. Es kommen alle Oberflächen in Frage, die eine Funktionalisierungsschemie gestatten, wie z.B. Zellulosemembranen, Glas, funktionalisierte Kunststoffe oder Goldoberflächen. Auch der Auswahl von Größe und Form der Oberflächenstrukturen sind keine Grenzen gesetzt. Es können planare Oberflächen, Beads, kolloidales Gold, Nanopartikel, Fullerene oder Oberflächen von Dendrimerstrukturen als Kompartiment benutzt werden. Wir vermuten, dass Mikrostrukturen mit konkaven Kavitäten an Oberflächen eine besondere Bedeutung bei dieser Methode erlangen können. Die benutzte Oberfläche für das „reversible Imprinting“ besitzt mehr als nur eine Trägerfunktion. Es ist denkbar, diese Methode auf (in) Lipidmembranen, wie z.B. Liposomen oder anderen Grenzflächen einzusetzen. Hier können diese Einflüsse eine dominierende Rolle bei der Ausbildung des supramolekularen Erkennungssystems ausüben. Der besondere Vorteil dieser neuen Technik liegt darin, dass sie in sehr kleinen Kompartimenten als auch auf sehr großen Oberflächen anwendbar ist.

A) Preparation von Oberflächen zur gezielten Verankerung von Templat- oder Matrizenmolekülen

Für die gezielte Verankerung von Matrizenmolekülen, sowie von reaktiven zu reversiblen chemischen Reaktionen befähigten Gruppen, an Oberflächen, wie z.B. Zellulose, sind inzwischen geeignete, sehr schonende Verfahren entwickelt worden. Mit Hilfe dieser neuen Methoden ist es zunächst möglich, Aminofunktionalitäten in kontrollierter Weise auf (Zellulose)oberflächen zu erzeugen (K.-H. Glüsenkamp, Patentanmeldung 1996 „Verfahren zur chemischen kontrollierten Modifizierung von Oberflächen sowie von Acyl- und/oder Hydroxyl-Gruppen tragenden Polymeren“ DE 196 24 990.2).

Für die gezielte Verankerung von Funktionalitäten, Liganden und Biomolekülen mit den vorher eingeführten Aminogruppen ist ein sehr schonendes und bisher nicht bekanntes Kopplungsverfahren erarbeitet worden. (K.H. Glüsenkamp and G. Eberle-Adamkiewicz, Patent: Immobilising of Biomolecules and Affinity Ligands on Polymer Carriers with Quadratic Acid Derivatives. Ger Offen., DE 4341524 C2, 931206 (Priority Date), 970116 (International Date)“) Aus diesen Druckschriften geht hervor, dass diese Methode eine stabilen Verankerung von Proteinen und Liganden auf Oberflächen, wie z.B. Membranen erlaubt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden weitergehende Eigenschaften dieser Methode gefunden, die einen weiteren überraschend einfachen Weg zu neuartigen reaktiven Oberflächenstrukturen ermöglicht. Diese so aktivierten Oberflächen führen überraschenderweise zu einer weiteren Weg, um künstliche Rezeptoren zu generieren.

Die Imprinting-Prozesse sollen, wie oben beschrieben, unter physiologischen Bedingungen, also in wässrigen Systemen stattfinden. Somit ist die Kenntnis über die Reaktivität gegenüber den Liganden und über mögliche unerwünschte Konkurrenzreaktionen der aktiven Komponenten während der Imprinting-Prozesse von großer Wichtigkeit ist. Diese Reaktivität wird ausgenutzt, um die Liganden um ein Templatmolekül, nach erfolgter supramolekularer Optimierungsphase, chemisch über Amidbindungen zu fixieren. Die unerwünschte Konkurrenzreaktion zur Ligandenfixierung ist die Hydrolyse der Quadratsäureester zu Quadratsäure. Diese Untersuchungen zur chemische Stabilität der aktivierten Gruppen in wässrigen Systemen in Abhängigkeit vom pH-Wert ergaben nun ein überraschendes Reaktionsverhalten. Bei pH 9.0 hydrolisierten in 24 h etwa 50 % der aktiven Gruppen. Nach Extrapolation der Hydrolysedaten bei pH 5.5-6.0 hydrolisierten in 3 Jahren nur 25 % der aktivierten Quadratsäureestergruppen (S. Tabelle 1, Abschnitt Ausführungsbeispiele). Diese Daten wurden bei 37°C ermittelt. Bei Raumtemperatur oder bei 4°C ist die Hydrolyse noch entsprechend langsamer. Die gewünschte Ligandenfixierung ist per se (ohne supramolekulare Wechselwirkung) 10-100 mal schneller als die Hydrolyse (bei gleichen experimentellen Bedingungen). Durch supramolekulare Wechselwirkung von entsprechenden Liganden (z.B. arom. Aminosäuren aus einem Cocktail der 20 natürlichen Aminosäuren) wird die Bereitschaft zur Fixierung der Liganden (Amidbindung) weiter be-

schleunigt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist um so schneller, je optimaler die supramolekulare Liganden-Assoziation sich ausgeprägt hat. Es handelt sich hier um einen extrem nicht-linearen kinetischen Fixierungsprozess; bei der Nachbargruppeneffekte eine bedeutende Rolle spielen. Durch die induzierte räumliche Nähe von Aminogruppen der entsprechenden Liganden mit den reaktiven Gruppen wird ihre chemische Reaktion stark beschleunigt. Diese neue Vorgehensweise eröffnet die Möglichkeit, kombinatorische Techniken zur Generierung und Optimierung von künstlichen Rezeptoren heranzuziehen. Durch die große Zahl von möglichen Ordnungsparametern (pH, Temperatur, Art und Struktur der Oberfläche und Zusammensetzung des Ligandencocktails, Anwendung von Parameter-Zeit Gradienten usw.) bieten sich z.B. mikrotiterplatten-gestützte Optimierungsverfahren an.

Eine weitere Vorbedingung für den Imprinting-Prozess ist eine Fixierung von Templatemolekülen, wie z.B. Nukleoside, Hormone etc. Diese Fixierung kann eine physikalische Adsorption als auch eine kovalente Fixierung sein. Die Kopplungschemie bzw. Adsorptionsprozesse müssen so gewählt werden, daß nach erfolgter Imprinting-Reaktion die Template schonend und chemoselektiv abgespalten werden können. Es sind verschiedene Varianten erarbeitet worden, um Template auf der Oberfläche zu fixieren. Als überraschend positiv erwiesen sich Boronsäure-Derivate (Abbildung 2). Allerdings war es in einigen Fällen nötig, eine Schutzgruppenstrategie für die aminreaktiven Gruppen auf der Oberfläche zu entwickeln, da z.B. die Fixierung eines Arylboronsäuretemplates mit z.B. einer Zellulosemembran einen pH von mindestens 8.5 erfordert (Abbildung 2).

Dieser pH-Wert führt schon zu einer nicht gewünschten Hydrolyse der aktivierten Quadratsäuregruppen. Die Lösung dieses Problems konnte durch Applikation von Cyclodextrinen im Reaktionsmedium gelöst werden. Überraschenderweise bildeten sich Quadratsäureester-Cyclodextrin Wirt-Gast-Systeme aus, die eine ausreichende Schutzfunktion gegenüber Hydrolysereaktion ausübten. Selbst bei Applikation von 1.0 Molarer NaOH wurden die reaktiven Gruppen vor Hydrolyse geschützt. Nach erfolgter Fixierung der Boronsäureester können die Cyclodextrine durch Competition mit z.B. p-Toluosulfonsäure oder anderen Wirten abgelöst und somit einfach entfernt und für den Imprinting-Prozess reaktiviert werden. Für Imprintingprozesse unter physiologischen Bedingungen ist es von

Vorteil sterile Komponenten einzusetzen. Während Lösungen ohne weiteres sterilfiltriert werden können, ist dies bei festen Phasen, wie z.B. Zellulosemembranen nicht möglich. Überraschenderweise war es möglich, Quadratsäureaktivierte Oberflächen wie z.B. funktionalisierte Glasoberflächen zu erhitzen, ohne dass dabei ein Aktivitätsverlust zu beobachten war. Dieses eröffnet die nicht vorherzusehende Möglichkeit, aktivierte Oberflächen beliebig lange chemisch zu konservieren (lange Lagerzeiten in wässrigen Systemen). Die Schutzfunktion der Cyclodextrine ist aber nicht nur auf Quadratsäuregruppen, sondern auch auf Maleinimide, Azlactone, SPDP-Gruppe, Vinylsulfone, Imidester wie z.B. Succinimide etc. anwendbar, wenn entsprechende modifizierte Cyclodextrine eingesetzt werden, die optimale Wirt-Gast-Systeme ausbilden.

B) Reduplizierung von aktiven Gruppen zur Erhöhung der Kapazität und Ligandendichte,

sowie Veränderungen von Oberflächengeometrien.

Diese erarbeitete Methode erlaubt auch in schonender Weise Dendrimere auf Oberflächen zu immobilisieren. Wir haben diese hochverzweigten Moleküle als Oberfläche für den dynamischen Imprintingprozess ausgewählt, da Verzweigungsgrad und Generation dieser inzwischen kommerziell erhältlichen Makromoleküle (Dendritec, USA) die Anzahl und Dichte der funktionellen Gruppen an der Oberfläche des Dendrimers bestimmen.

Abbildung 3 zeigt beispielhaft immobilisierte Dendrimere auf Oberflächen. Das „D“ repräsentiert das Dendrimermolekül, auf dem 63 Aminogruppen radialsymmetrisch verteilt sind. Diese noch verbleibenden Aminogruppen (eine Aminogruppe wird für die Verknüpfung mit der Oberfläche benutzt) können für die Immobilisierung der Templatmoleküle bzw. der funktionellen Gruppen für die reversible Ligandenanbindung eingesetzt werden. Diese Reduplizierungsstrategie für funktionelle Gruppen ist für beliebige Polyamine, wie z.B. Polyethylenimin, Polyvinylimin, Chitosan, Polylysin etc. anwendbar.

Außerdem können beliebige Ausführungsformen von Oberflächen wie z.B. aminofunktionalisierte Mikrotiterplatten, aminofunktionalisierte Goldoberflächen, aminofunktionalisiertes Glas, aminofunktionalisierte Kohlenstoff (Elektroden, Nanopartikel), aminofunktionalisierte Magnetpartikel etc. Diese Möglichkeit, Aminogruppen auf Oberflächen

zu reduplizieren, ist eine wichtige Voraussetzung zur Herstellung von künstlichen Rezeptoren mit hohen Ligandendichten.

So ist es möglich, bisher nicht bekannte aktivierte Oberflächenstrukturen herzustellen. Abbildung 4 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt von einer Oberfläche, mit einer hohen Dichte an chemisch reaktiven Quadratsäuresterguppen. Diese reaktive Oberfläche eignet sich überraschenderweise gut, um Membranen mit hoher Dichte an künstlichen Rezeptoren, nach dem oben beschriebenen Imprintingverfahren zu erzeugen.

C) Reversible Ligandenaustauschreaktionen und irreversibler Reaktionsschritt zur Fixierung des Ligandenarrangements

Eine wichtige Bedingung zur Verwirklichung des neuen Konzeptes zu selbstoptimierenden supramolekularen Strukturen ist Fähigkeit zur kontrollierten, reversiblen chemischen Reaktionsführung. Diese neuartige reaktive Schutzgruppen sind entwickelt worden, um neue Prodrugs für die Chemotherapie maligner Tumoren herzustellen (K.-H. Glüsenkamp. Neue bicyclische Anhydride, Verfahren zu ihrer Herstellung, ihre Verwendung als pH-labiles sowie enzymatisch induziert abspaltbares Maskierungsmittel, Immobilisierungs- und Transportmittel für aktive Wirkstoffe. Deutsche Patentanmeldung, 1993.).

Das besondere an diesen Strukturen ist die Möglichkeit, durch Auswahl von Schlüsselsubstituenten die Reaktionsfähigkeit zu modulieren. Die Abbildung 5 zeigt diese Verbindungsklasse hochsubstituierter bicyclischer Anhydride. Diese bicyclischen, rigiden chemischen Strukturen bestehen aus drei wichtigen Strukturelementen (siehe Abbildung 5):

1. aus einer Anhydridfunktionalität,
2. aus ausgewählten Substituenten, die einen kontrollierten Einfluss auf die Reaktivität ausüben,
3. aus einer Kopplungsgruppe, die eine chemoselektive Verknüpfung z.B. mit den Endgruppen des Dendrimers erlaubt.

Überraschenderweise stellten wir fest, dass bei pH 6-7 das Anhydrid und nicht die Dicarbonsäure als reaktive chemische Spezies in Wasser dominiert. Unter physiologischen Bedingungen reagieren Amine wie z.B. Aminosäuren zu Carboxyamide und es stellt sich ein chemisches Gleichgewicht zwischen Anhydrid und Carboxyamid ein. Reaktionskinetische Experimente zeigen, dass die Reaktion zum Carboxyamid unter physiologischen

Bedingungen reversibel verläuft. Durch Veränderung der funktionellen Gruppen kann die Lage des Gleichgewichtes und die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst werden. Diese große Reaktivitätsvielfalt der unterschiedlichen substituierten bicyclischen Carboxyamide ermöglicht die Auswahl geeigneter Funktionalitäten für ein reversibles Imprintingverfahren. Die Lage des Gleichgewichtes kann durch die Temperatur, Konzentration der Liganden und pH-Wert beeinflusst werden.

Die Möglichkeit der gezielt reversiblen Reaktionsführung ist eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für die Realisierung unseres Konzeptes. Ein weiterer Schritt, nämlich die chemische Fixierung des Ligandenarrangements, ist notwendig, um physikalisch-chemisch stabile Rezeptoren zu generieren. Überraschenderweise entdeckten wir einen weiteren Reaktionsweg der bicyclischen Carboxyamide. Wird der pH-Wert der wässrigen Lösung auf 8.5 bis 9.5 angehoben, setzt eine irreversible Imidbildung ein. Ausserdem wird unter diesen Bedingungen die Rückreaktion zum Anhydrid gestoppt und es können keine Liganden mehr abgespalten werden. In Abbildung 5 ist diese Reaktionsfolge beschrieben. Diese so gebildeten Imide sind unter physiologischen Bedingungen stabil.

Abbildung 7 soll zusammenfassend, ohne dass eine Beschränkung das Prinzip des reversiblen Imprintings an einem konkreten chemischen Beispiel deutlich machen. Das Templatmolekül wird zunächst unter kontrollierten Bedingungen mit dem Dendrimer kovalent verknüpft. Die Chemie ist so gewählt, dass nach erfolgter Fixierung des Ligandenarrangements eine gezielte Abspaltung, z.B. durch Mercaptoethanol, möglich wird. Die bicyclischen Anhydride werden über eine Seitenkette gezielt mit den noch verbleibenden Aminogruppen stabil verknüpft. Dann können Liganden (z.B. Aminosäuren, Oligopeptide und Peptidfragmente) mit den Anhydridfunktionalitäten reversibel zu Carboxyamiden reagieren. Die Reaktionsbedingungen hierfür sind so zu wählen, dass kooperative Effekte zwischen Liganden und Templaten (und zwischen den verschiedenen Liganden) das reaktionskinetische Netzwerk zur Bildung des thermodynamisch stabilsten Ligandenarrangements veranlassen können. Nach erfolgter Formierung des Supramoleküls wird dann durch einen pH-Schift auf 8.5-9.5 die Imidbildung eingeleitet (s. Abbildung 6). Schließlich können mit disulfidspaltenden Reagenzien die Template von der Dendrimeroberfläche abgelöst werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren I ermöglicht durch die Kopplung einer bicyclischen Anhydrid-Verbindung an die mit dem Templat verbundene Polymer-Dendrimer-Verbindung und Aktivierung der Anhydridfunktionalität, daß die z.B. Aminosäuren als Liganden an das an die mit dem Templat verbundene Polymer-Dendrimer-Verbindung gekoppelte Anhydrid-Derivat reversibel physiologischen Bedingungen wie pH-Wert 7 gebunden wird. Das an die Polymer-Verbindung gekoppelte Templat, welches einer biologisch oder pharmakologisch wirksamen Verbindung zumindest teilweise in Bezug auf Konformation und Konfiguration entspricht, bestimmt das Ausmaß der Bindung, den Bindungsort des Liganden und die Liganden als solche. Zudem dient das Templat ist also die Vorlage für die reversible Verbindung der Liganden.

Die als Negativabbildung des Templat an Anhydrid- Dendrimer-Verbindung gekoppelten Liganden geben die Konfiguration und Konformation des Templats an. Diese Information kann kurzzeitig bei pH 7 als Kurzzeitgedächtnis sein oder, falls der pH-Wert auf 8,5 gesteigert wird, eine irreversible Imidbindung, auch genannt chemisch Fixierungsschritt oder Stabilisierungsschritt genannt, hervorrufen. Die irreversible Imidbindung ist dauerhaft und steht einer langfristig gesicherten Information über das Templat als Langzeitgedächtnis gleich. Die Informationsteuerung kann erfolgen mittels Variation der Inkubationsbedingungen mit Liganden, wie Zeit, Inkubationsdauer, Temperatur, pH. So können zum Beispiel bei Änderung der Temperatur bereits gekoppelte Liganden L 4, die zu einer Kopplung von L5 führten, durch Liganden L9 bei pH 7 verdrängt und diese das Koppeln der L10 ermöglichen, so daß wie bei einem elektronischen Datenspeichergerät bzw. Datenspeicher die zu speichernde Information quasi überschrieben und hierdurch geändert werden kann.

Eine Löschung -als Teillöschung- der als reversible Bindung der Liganden bereitgestellten Information erfolgt durch Senken des pH der Inkubation mit Liganden auf zum Beispiel 5,0 zu Rezyclisierung des an Polymer-Dendrimer-Verbindung gekoppelten Dendrimers. Ebenso kann eine vollständige Löschung – Volllöschung- der Information erfolgen, durch Lösen des Templats von der Polymer-Dendrimer-Verbindung, indem die auf z.B. elektrostatischer Wechselwirkung beruhenden Bindung wie Ionen-Bindung, hydro-

phobe Bindung oder dergleichen, des Templat durch Änderung von Zusammensetzung und / oder Konzentration des Inkubationsansatzes geändert wird.

Durch die Möglichkeit der Kurzzeit-, Langzeitspeicherung, der Teil- und Voll-Löschung von Informationen werden durch die erfindungsgemäßen Verfahren I und II ein
5 chemischer Datenspeicher bereitgestellt, welcher ebenso Informationen, auch in digitalisierter Form, zu erfassen vermag.

Das erfindungsgemäßen Verfahren II betrifft vielmehr die irreversible in Abhängigkeit von dem Templat erfolgende Kopplung von Liganden an Polymer-Dendrimer-Verbindungen, wobei Cyclodextrine, pH, Konzentrationen, Temperatur, Inkubationsdauer, Zusammensetzung von Inkubationen als Schutzgruppen ebenso Reaktionen zu steuern
10 vermögen.

Ausführungsbeispiele

Beispielhaft sollen Imprintingexperimente auf Zellulosemembranen und aminofunktionalisierten Mikrotiterplatten-Wells dargelegt werden, ohne dass eine Beschränkung der
15 Erfindung erfolgen soll. Als vorteilhaft haben sich Papiermembranen der Firma Schleicher&Schüll (Durchmesser 6 mm, Einzelgewicht 2 mg) bewährt, da diese in Mikrotiterplatten eingelegt werden können. Für die Experimente von aminofunktionalisierten Mikrotiterplatten sind die Produkte der Firma Costar benutzt worden.

1. Herstellung von funktionalisierten Oberflächen aus Voraussetzung zur
20 kontrollierten Verankerung von Templat- und Ligandenmolekülen

1. Herstellung von aminofunktionalisierten Zellulosemembranen

a) Aminopropylierung von Zellulosemembranen

500 Scheiben 595 Membranfilter (Schleicher&Schuell), Durchmesser 6 mm, werden in einem entsprechenden flachen Glasreaktor in 3 % NaOH ($H_2O:MeOH = 4:1$) innerhalb
25 von 15 min auf 70° - 90° C erhitzt und anschließend 2.0 g (0.007 Mol) 3-Brompropylphthalimid, gelöst in 20 ml MeOH in 3 Portionen über einen Gesamtzeitraum von 60 Min dazugegeben. Nach weiteren 30 min wird 5 g Ammoniumsulfat hinzugefügt und für weitere 30 min erhitzt. Danach wird die Membran zuerst in 2 % Essigsäure/Wasser und dann mit Wasser gewaschen und getrocknet.

30 b) Mikrowellen-gesteuerte Aminopropylierung von RC-55-Membranen

500 Scheiben 595 Membranfilter (Schleicher&Schuell), Durchmesser 6 mm, werden in einem entsprechenden flachen Glasreaktor in 3 % NaOH ($H_2O:MeOH = 4:1$) 1 min unter einer Argonatmosphäre in einem Mikroprozessor-gesteuerten Mikrowellenreaktor (MLS-1200 mega) mit 600 W und einer Frequenz von 2,45 Ghz bestrahlt und anschließend 2.0 g (0.015 Mol) 3-Chlorpropylamin, gelöst in 20 ml MeOH dazugegeben und weitere 4 min bestrahlt. Danach wird die Membran zuerst in 2 % Essigsäure/Wasser und dann mit Wasser gewaschen und getrocknet.

2. Herstellung von quadratsäureaktivierten Zellulosemembranen

a) Aktivierung von Aminopropylzellulose

500 Scheiben 595 3-Aminopropyl-Membranfilter (Schleicher&Schuell), werden in einem Methanolbad (flacher Glasbehälter) mit 0.17 g (0.001 Mol) Quadratsäuredimethylester und 0.156 g (0.002 Mol) Triethylamin versetzt und das Bad 10 h bei Raumtemperatur leicht auf ein Schüttler bewegt. Danach werden die Membranen mit Alkohol gewaschen und luftgetrocknet. Kapazität: 80 nMol Quadratsäuregruppen/Scheibe.

b) Einführung von Polyethylenglycol-“spacer“

500 Scheiben 595 Rundfilter (Durchmesser 6 mm, Schleicher&Schuell), werden in einem Methanolbad mit 0.5 g (0.002 Mol) Polyethylenglycol-diamin (mittleres Molekulargewicht 230 g/Mol) und 0.156 g (0.002 Mol) Triethylamin versetzt und das Bad 10 h bei Raumtemperatur leicht auf ein Schüttler bewegt. Danach werden die Filter mit Alkohol gewaschen und luftgetrocknet.

c) Aktivierung der entstandigen Aminogruppen mit Quadratsäurediethylester

500 Scheiben Rundfilter (Durchmesser 6 mm, Schleicher&Schuell), werden in einem Methanolbad (100 ml) mit 0.17 g (0.001 Mol) Quadratsäurediethylester und 0.156 g (0.002 Mol) Triethylamin versetzt und das Bad 10 h bei Raumtemperatur leicht auf ein Schüttler bewegt. Danach werden die Filter mit Alkohol gewaschen und luftgetrocknet. Mit Hilfe von Fluorescein-markiertem Serumalbumin (BSA) wurde die Beladungskapazität der aktivierten Membranen bestimmt. Bei einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml konnte pro Rundmembran bis 50 µg Protein bei pH 8.5 Borat-Puffer innerhalb von 10h immobilisiert werden.

3. Herstellung von dendrimerfunktionalisierten Zellulosemembranen

a) Immobilisierung von Starburst Dendrimer Generation 4 (Fa. Aldrich)

300 3-Aminopropyl-Membranfilter (unter 2 a hergestellt) (Schleicher&Schuell), werden in einem Methanolbad (flacher Glasbehälter) mit 0.3 g (0.02 mMol) Dendrimer Generation 4 (MG: 1425 g/Mol) und 0.156 g (0.002 Mol) Triethylamin versetzt und das
5 Bad 24 h bei Raumtemperatur leicht auf ein Schüttler bewegt. Danach werden die Membranen mit Alkohol gewaschen und luftgetrocknet.

b) Aktivierung der entstandigen Aminogruppen mit Quadratsäurediethylester

200 Rundfilter (unter 3 a hergestellt, Durchmesser 6 mm, Schleicher&Schuell), werden in einem Methanolbad (100 ml) mit 0.17 g (0.001 Mol) Quadratsäurediethylester und 0.156 g (0.002 Mol) Triethylamin versetzt und das Bad 48 h bei Raumtemperatur
10 leicht auf ein Schüttler bewegt. Danach werden die Filter mit Alkohol gewaschen und luftgetrocknet. Mit Hilfe von Fluorescein-markiertem Serumalbumin (BSA) wurde die Beladungskapazität der aktivierten Membranen bestimmt. Bei einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml konnte pro Rundmembran bis 500 µg Protein bei pH 8.5 Borat-Puffer inner-
15 halb von 24h immobilisiert werden. Dies ergibt eine Kapazitätserhöhung (Proteinimmobilisierung) gegenüber den unter 2c hergestellten Membranen um den Faktor von 10. Die Beladungsdichte an Quadratsäureendgruppen beträgt 3.2µMol/Scheibe.

b) Dotierung der Dendrimeroberfläche mit Cysteamingruppen zur reversiblen kovalenten Verknüpfung von Templat-Molekülen über Disulfidgruppen

20 100 Scheiben Rundfilter (unter 3 b hergestellt, Durchmesser 6 mm, Schleicher&Schuell), werden in einem Methanolbad (100 ml) mit (0.003 mMol) Cysteaminhydrochlorid und 0.05 g Triethylamin versetzt und das Bad 48 h bei Raumtemperatur leicht auf ein Schüttler bewegt. Danach werden die Filter mit Alkohol gewaschen und luftgetrocknet. Die Reagenzien sind so bemessen, daß nicht mehr als 1/10 der möglichen Quadratsäuregruppen reagieren können.
25

4. Funktionalisierung von Mikrotiterplatten-Oberflächen

a) Quadratsäurefunktionalisierung der Oberfläche

10 Platten (960 Wells) der Fa. Costar werden mit einer 0.05%igen Lösung von Quadratsäurediethylester und Triethylamin in MeOH (100 µl/Well) für 2 h versetzt. Danach
30 wird intensiv mit MeOH gewaschen und luftgetrocknet.

b) Kapazitätserhöhung der Kunststoffoberfläche durch Reduplizierung der funktionellen Gruppen

5 Platten (unter 4 a hergestellt) werden mit einer 0.05%igen Lösung von Polyethylenimin (Fa. Sigma, Mg: 10000) in MeOH (100µl/Well) für 24 bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird intensiv mit MeOH gewaschen und luftgetrocknet. Durch diese Vorgehensweise konnte die Konzentration der verfügbaren Aminogruppen /Well um den Faktor 20 gesteigert werden.

c) Quadratsäurefunktionalisierung der mit Polyethylenimin kovalenten dotierten Oberfläche

3 Platten (unter 4 b hergestellt) werden mit einer 0.05%igen Lösung von Quadratsäurediethylester (Fa. Aldrich) in MeOH (100µl/Well) für 24 bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird intensiv mit MeOH gewaschen und luftgetrocknet. Durch diese Vorgehensweise konnte die Konzentration der verfügbaren Quadratsäuregruppen /Well um den Faktor 20 gesteigert werden.

d) Dotierung der Oberfläche mit Glukosamin zur reversiblen kovalenten Verankerung von Boronsäuretemplaten

2 Platten (unter 4 c hergestellt) werden mit einer 0.01%igen Lösung von Glukosamin in MeOH versetzt (100 µl/Well). Nach 12 h wird intensiv mit Alkohol gewaschen und luftgetrocknet. Die Reagenzien sind so bemessen, daß nicht mehr als 1/10 der möglichen Quadratsäuregruppen reagieren können.

5. Stabilitätsuntersuchungen (Hydrolyseexperimente) von reaktiven Quadratsäuregruppen auf Zellulose-Oberflächen in 20% Ethanol/Wasser (37°C) bei pH 5.5 bis pH 9.5

Für diese Experimente wurden jeweils 100 Membranen (unter 2a hergestellt) in 20 ml Puffer (100 mM Citrat/20% Ethanol pH 5.5, 20 mM Phosphat/20% Ethanol pH 6.5, PBS/20 %Ethanol pH 7.0, Carbonat/20% Ethanol pH 8.5 und 30 mM Borat/20% Ethanol pH 9.3) gegeben und bei 37° inkubiert.

Für eine Woche jeden Tag, danach wochenweise wurden jeweils etwa 20 Membranen entnommen und die Puffer durch Filtration entfernt. Die Membranen wurden jeweils mit 2 ml Cytochrom C-Lösung (1mg/ml; 100 mM Borat; pH 9.3) für 6 h versetzt und so die Kopplungsgeschwindigkeit bzw. Kapazität ermittelt.

Die Membranen in 30mM Borat/20% Ethanol zeigten nach 72 h Inkubation einen Aktivitätsverlust gegenüber den Kontrollen von etwa 50%. Die Membranen, die in Carbonat pH 8.5 inkubiert wurden, zeigen diesen Aktivitätsverlust erst in etwa 2 Wochen. Die Inkubation bei pH 7.0 führte erst nach 6 Monaten zu einem messbaren Aktivitätsverlust von etwa 30-50 %. Dagegen führten die Inkubation bei 6.5 und pH 5.5 in der Zeitspanne zu keinem messbaren Aktivitätsverlust.

6. Imprintingexperimente mit Phenylboronsäure in Mikrotiterplatten

Eine Platte mit (Hergestellt unter 4 d) glucosamindotierter Oberfläche wurde zunächst mit einer Lösung von 0.01 % von β -Cyclodextrin in PBS für 10 min inkubiert. Danach wurde intensiv mit PBS gewaschen und dann eine 0.1 %ige Lösung von Fluorescein-Boronsäure (s. Abb. 2, Beschreibung) in Carbonat pH 8.6 für 5 h appliziert. Danach wurde der nicht gebundene Farbstoff durch Waschen mit Carbonat-Puffer entfernt und anschließend eine 0.1%ige Lösung von p-Toluolsulfonsäure in Wasser/Ethanol (90:10) dazugegeben, um die Cyclodextrinschutzgruppen kompetitiv zu verdrängen.

Ein Cocktail der 20 natürlichen Aminosäuren (jeweils 10 mMolar, pH 7.5, 0.2 % Azid) wurde dann für 24 h appliziert, um eine templatgesteuerte Ligandenanbindung zu induzieren. Nach beendeter Ligandenfixierung wurde intensiv mit PBS gewaschen und dann der pH auf 4-5 (citratpuffer) gestellt, um die Boronsäure-Template abzulösen. Dieser Vorgang ist mit Hilfe der UV-Spektroskopie zu beobachten und erforderte in diesem Fall 8 h. Als Kontrollexperiment wurde eine Platte behandelt, die nicht mit fluoresceinboronsäure behandelt war. Die Bindungskapazität der einzelnen Wells war mit 2 nMol/Well sehr einheitlich und wurde mit Carboxyfluorescein als Ligand UV-spektroskopisch bestimmt. Die Kontrollplatte zeigte keine einheitlichen Bindungseigenschaften.

7. Imprintingexperimente mit dendrimerfunktionalisierten Zellulosemembranen

10 Rundfilter der cysteamindotierten Zellulosemembranen (unter 3b hergestellt) wurden mit 200nM Coenzym A (Fa. Aldrich) in PBS für 1 h behandelt. Diese Prozedur führte zur quantitativen Immobilisierung von Coenzym A via Disulfidgruppen. Das bicyclische Anhydrid-Derivat (s. Abbildung 8) wird dann (50 mM in MeOH) für 10 h auf die Rundfilter gegeben.

Die noch verbliebenen Quadratsäuregruppen wurden so quantitativ substituiert. Danach wurde für 1 h der pH-Wert auf 5.0 abgesenkt, um N-Methylethanolamin abzuspalten. Dadurch wurden die Anhydridfunktionalitäten reaktiviert. Ein Cocktail der 20 natürlichen Aminosäuren (jeweils 10 mMolar, pH 7.5, 0.2 % Azid) wurde dann für 24 h appli-

5 ziert, um eine templatgesteuerte Ligandenanbindung zu induzieren. Nach beendeter Ligandenbindung wurde dann der pH für 10 h auf 9.5 gestellt, um die Liganden als Imid zu fixieren (s. Abbildung 6). Als Kontrollexperiment wurden Zellulosemembranen behandelt, auf die nicht Coenzym A immobilisiert worden ist. Durch Behandlung mit DTT oder Mercaptoethanol wurden quantitativ die Templat-Moleküle abgespalten und durch Auswa-

10 schen mit Puffer entfernt. Die Bindungskapazität der einzelnen Membranen war mit 1 nMol/Scheibe einheitlich und wurde mit einem Coenzym A-N-Ethyl-Maleinimid-Addukt als Ligand UV-spektroskopisch bestimmt. Die Kontrollscheiben zeigten keine einheitlichen Bindungseigenschaften.

15

20

25

30

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung, vorzugsweise an einer stabilisierten Oberfläche derselben, mit Bindungsstellen zur Bindung von biologisch oder pharmakologisch aktiven Substanzen durch
 - 5 c) Immobilisierung von Templat-Molekülen, welche biologisch oder pharmakologisch wirksame Verbindungen sind, an der polymeren Verbindung,
 - d) Koppeln von reaktiven funktionellen Gruppen an die polymere Verbindung zur Bindung von Liganden unter physiologischen Bedingungen,
 - c) Bindung von Verbindungen als Liganden an die reaktiven Gruppen,
 - 10 d) vorzugsweise Stabilisierung der an den reaktiven Gruppen gebundenen benachbarten Verbindungen miteinander zur chemischen Stabilisierung der Liganden an der polymeren Verbindung und
 - e) Ablösen der Templat-Moleküle.
2. Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass Immobilisierung von Templat-Molekülen mittels kovalenter Bindung oder elektrostatischer Wechselwirkung an der Oberfläche der polymeren Verbindung durchgeführt wird.
3. Verfahren 1 zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer Polymer-Verbindung zur Bindung von biologisch oder pharmakologisch aktiven Substanzen, die ein Templat sind, vorzugsweise an stabilisierten Oberflächen einer polymeren Verbindung, **dadurch gekennzeichnet**, dass
 - 20 a) eine Polymer-Verbindung zur Aminopropylierung mit einer Chlorpropylamin-Verbindung gelöst in MeOH in einem Wärmeschritt, vorzugsweise in einem Mikrowellenreaktor mit 600 Watt 1 bis 4 min lang bestrahlt, bevorzugterweise weitere 4 min lang bestrahlt wird, und dann nach Waschung mit wäßriger Essigsäure und aqua bidest getrocknet wird,
 - 25 b) die Polymer-Verbindung mit Aminopropyl-Gruppen zu Darstellung aktivierten Polymer-Verbindung mit einer Quadratsäureester-Verbindung und Triethylamin gelöst in MeOH bei RT 1 bis 24 stunden lang, inkubiert und nach einer Waschung mit ETOH
30 luftgetrocknet wird,

- c) die Polymer-Verbindung zur Darstellung einer Polymer-Dendrimer-Verbindung mit einem dendritischen Polymer und Triethylamin gelöst in MeOH bei RT 1 bis 24 Stunden lang inkubiert und nach einer Waschung mit EtOH luftgetrocknet,
- d) die Polymer-Dendrimer-Verbindung zur Darstellung aktivierter Polymer-Dendrimer-Verbindung und quantitativer Umsetzung von Aminen in Quadratsäureester-Derivate mit einer Quadratsäureester-Verbindung und Triethylamin gelöst in MeOH bei RT 48 Stunden lang inkubiert und nach Waschung in EtOH luftgetrocknet,
- e) die aktivierte Polymer-Dendrimer-Verbindung zur Darstellung von Cysteamin-Gruppen tragender Polymer-Dendrimer-Verbindung mit Cysteaminhydrochlorid und Triethylamin bei RT 24 Stunden inkubiert und nach einer Waschung mit EtOH luftgetrocknet,
- f) die Cysteamin-Gruppen tragende Polymer-Dendrimer-Verbindung zur Darstellung von mit dem Templat verbundener Polymer-Dendrimer-Verbindung mit der Templat-Verbindung 60 min lang in Phosphatpuffer pH 6,5 bis 7,0 inkubiert,
- g) dann die mit dem Templat verbundene Polymer-Dendrimer-Verbindung zur Substitution noch vorhandener Quadratsäure-Gruppen an der Verbindung mit einer bicyclischen Anhydrid-Verbindung in MeOH 1 bis 10 Stunden lang inkubiert,
- h) dann zur Abspaltung von N-Methylethanolamin und Aktivierung der Anhydridfunktionalitäten der Ansatz auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt wird,
- i) dann eine Amino-Gruppen tragende Verbindung in den Ansatz zugegeben und 1 bis 24 Stunden lang bei pH-7,5 zur Darstellung einer Templat-abhängigen Ligandenanbindung an die anhydridfunktionelle Gruppen enthaltende mit einem Templat verbundene Polymer-Dendrimer-Verbindung inkubiert wird,
- j) der Ansatz zur Fixierung der Liganden unter Imidbildung zwischen der Anhydrid-Gruppe und der Liganden auf pH-Wert 9,5 eingestellt und 10 Stunden lang stehen gelassen wird,
- k) nach einer Waschung des Ansatzes mit aqua bidest Zugabe von Mercaptoethanol im Überschuß zur quantitativen Entfernung von Templat-Verbindungen und eine Waschung des Ansatzes mit aqua bidest.

4. Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass als bicyclischen Anhydrid-Verbindung die Anhydrid-Verbindung VIII der Abb. VIII verwendet wird.
5. Verfahren II zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer Polymer-Verbindung zur Bindung von biologisch oder pharmakologisch aktiven Substanzen, die ein Templat sind, vorzugsweise an stabilisierten Oberflächen einer polymeren Verbindung, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- a) die Polymer-Verbindung zur Darstellung aktivierter Polymer-Verbindung mit einer Quadratsäureester-Verbindung und Triethylamin gelöst in MeOH bei RT 1 bis 2 Stunden lang inkubiert und nach einer Waschung mit MeOH luftgetrocknet wird,
- b) die aktivierte Polymer-Verbindung zur Erhöhung der an der Polymer-Verbindung gebundenen Amino-Gruppen mit Polyethylenimin in MeOH inkubiert und nach einer Waschung mit MeOH luftgetrocknet wird,
- c) dann die Polymer-Verbindung zur Darstellung hoch aktivierter Polymer-Verbindung mit einer Quadratsäureester-Verbindung und Triethylamin gelöst in MeOH bei RT 1 bis 24 Stunden lang inkubiert und nach einer Waschung mit MeOH luftgetrocknet wird,
- d) die hoch aktivierte Polymer-Verbindung zur Darstellung von mit glucosamindotierter Oberfläche enthaltende Polymer-Verbindung mit Glukosamin gelöst in MeOH bei RT 2 bis 12 Stunden lang inkubiert und nach einer Waschung mit EtOH luftgetrocknet wird,
- e) die mit glucosamindotierter Oberfläche enthaltende Polymer-Verbindung mit Cyclo-dextrin in Phosphatpuffer pH 6,5 bis 7,5 5 bis 10 min lang inkubiert, danach mit Phosphatpuffer pH 6,5 bis 7,5 gewaschen, dann
- f) die mit glucosamindotierter Oberfläche enthaltende Polymer-Verbindung zur Darstellung von Boronsäuretemplate-Polymer-Verbindung mit einer Boronsäureester-Verbindung, an welche ein Templat gekoppelt ist, in Carbonat-Puffer pH 8,0 bis 9,0 5 Stunden lang inkubiert und überschüssiges Boronsäureester-Verbindung durch Waschen mit Carbonat-Puffer entfernt wird,

- g) anschließend die Boronsäuretemplate-Polymer-Verbindung zur kompetitiven Entfernung von Cyclodextrin-Schutzgruppen mit p-Toluolsulfonsäure in aqua bidest/ EtOH in einer Mischung von 90/10 (V/V) gewaschen wird,
- h) anschließend wird Boronsäuretemplate-Polymer-Verbindung zur Templat gesteuerten
5 Ligandenbindung mit einer Mischung mit einer oder mehreren Verbindungen als Liganden bei pH 7,5 10 bis 24 Stunden lang bei RT inkubiert, danach mit Phosphatpuffer pH 6,5 bis 7,5 gewaschen, dann
- i) die Boronsäuretemplate-Polymer-Liganden-Verbindung zur Darstellung Polymer-Liganden-Verbindung mit einem Bindungsort als künstlicher Rezeptor für Templat
10 entsprechende biologisch oder pharmakologisch wirksame Verbindungen bei pH-Wert auf 4,0 bis 5,5 die Boronsäuretemplate entfernt, danach mit Citratpuffer pH 6,5 bis 7,5 gewaschen.
- 6 Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Polymer-Verbindung Cellulosemembran, Glas, Kunststoffoberfläche, vorzugsweise Mikrotiterplatten, eine dendrimere Verbindung oder eine Lipidmembran verwendet
15 wird.
7. Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Verbindung Aminosäuren, Nukleotide, Nukleoside verwendet werden.
20
8. Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung nach einem der Ansprüche 2 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Polymer-Verbindung ein Cellulosemembranfilter (Schleicher-Schüll) verwendet wird.
9. Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung nach einem der Ansprüche 2 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Templat-Verbindung Coenzym A verwendet wird.
25
10. Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung nach einem der Ansprüche 2 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass statt Schritt a) die Polymer-Verbindung zur Aminopropylierung nach Erhitzung auf 70 –
30 90° C mit methanolischer Brompropylphthalimid-Lösung in Gegenwart von NaOH

60 bis 120 min lang inkubiert und dann nach Waschung mit wäßriger Essigsäure und aqua bidest getrocknet wird.

11. Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung nach einem der Ansprüche 2 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die mit Schritt b) des Verfahrens I aktivierte Polymer-Verbindung zwecks Überprüfung der Aktivität der aktivierten Polymer-Dendrimer-Verbindung 1 bis 52 Wochen bei pH 5,5 bis 6,5 in Gegenwart von Cyclodextrin-Verbindung als Stabilisator bei RT stengelassen wird.

10

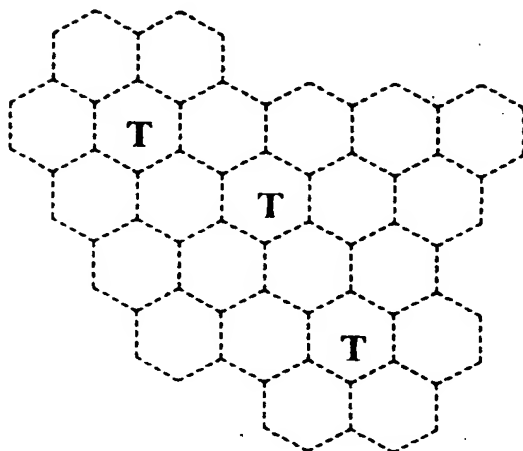
15

20

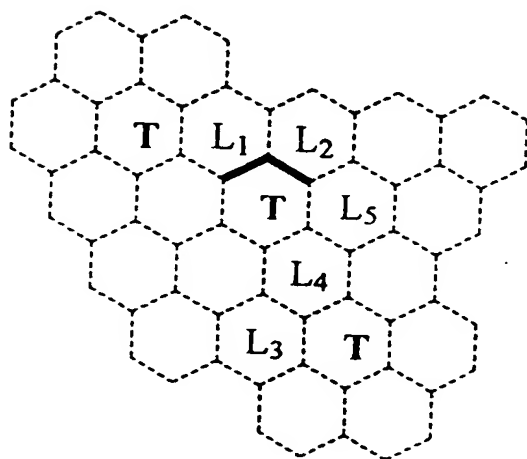
25

30

Abbildung 1

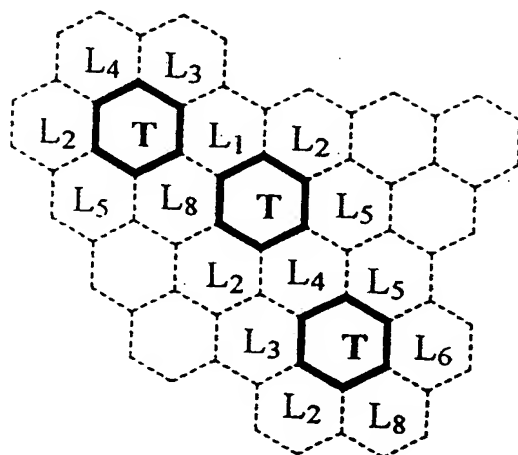


A



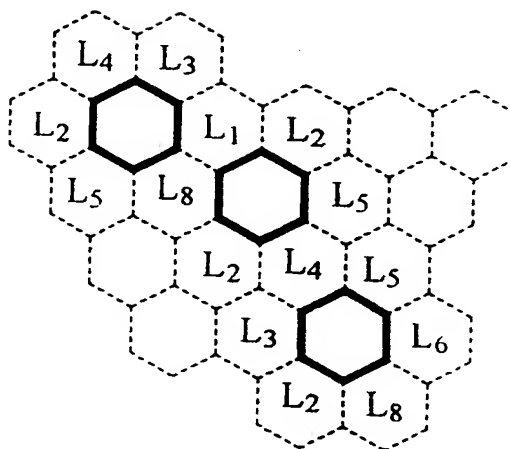
B

Abbildung 1



C

Abbildung 1



D

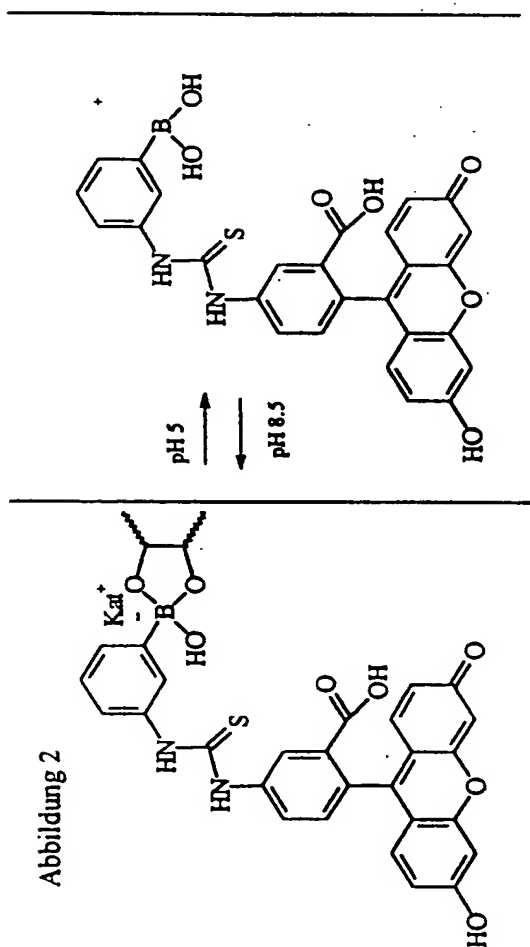


Abbildung 3

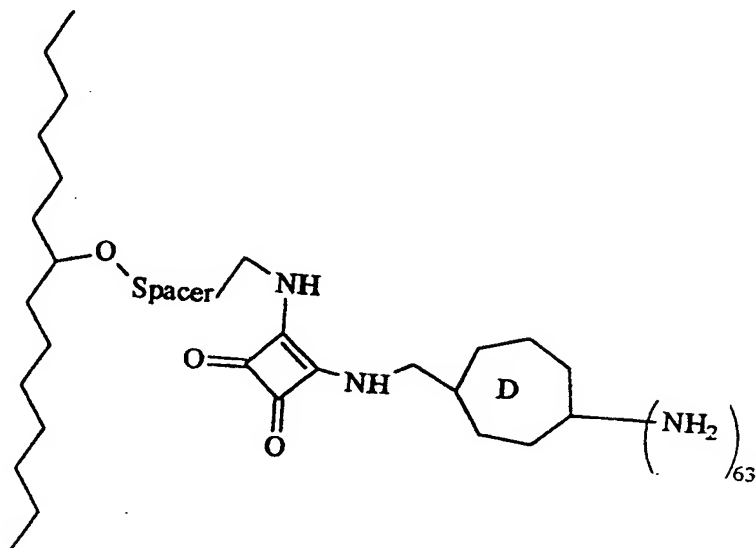


Abbildung 4

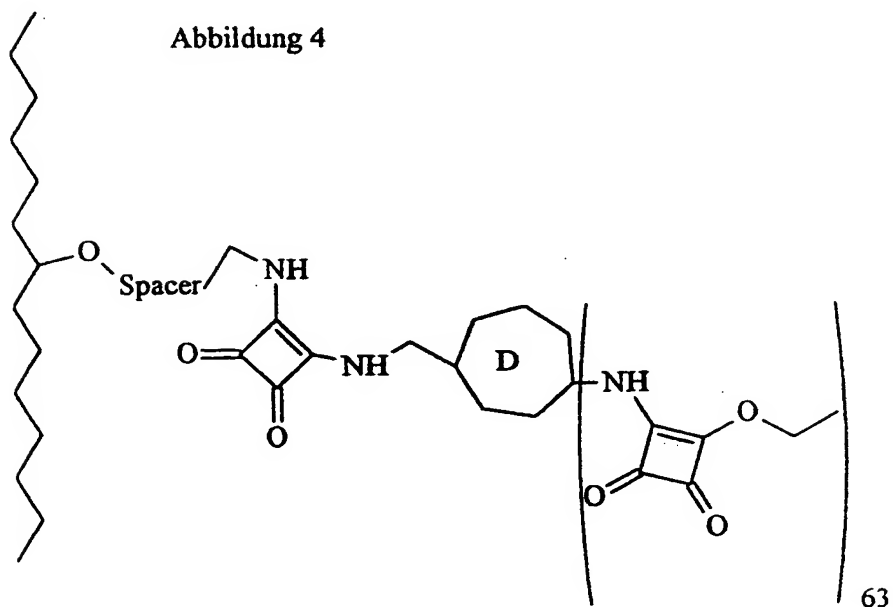


Abbildung 5

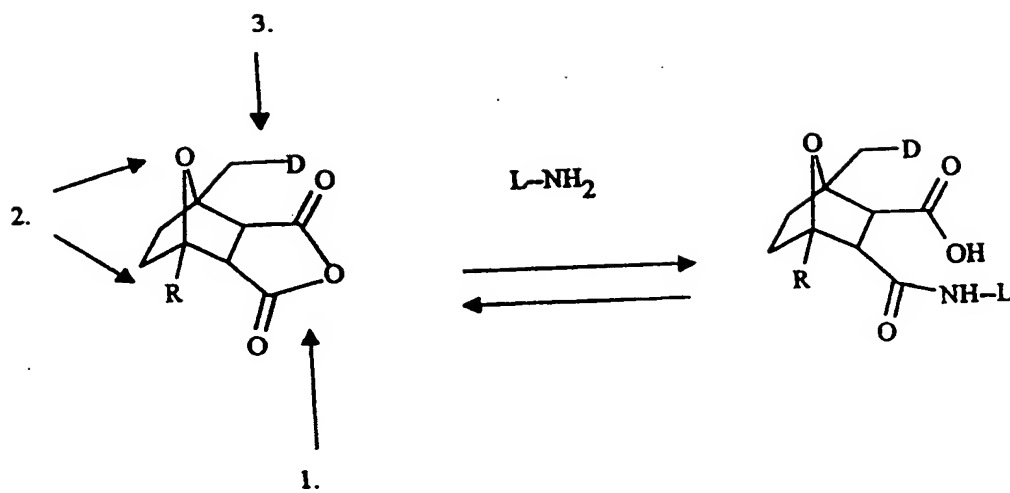
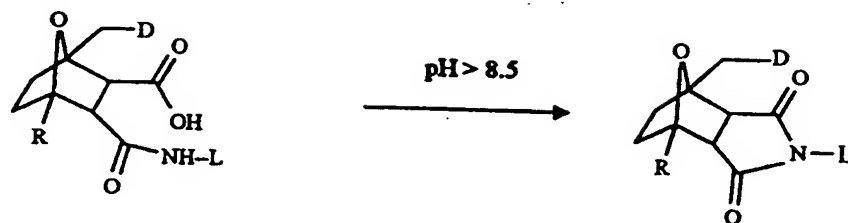


Abbildung 6



D = Deschidrin
L = Ligand

Abbildung 7

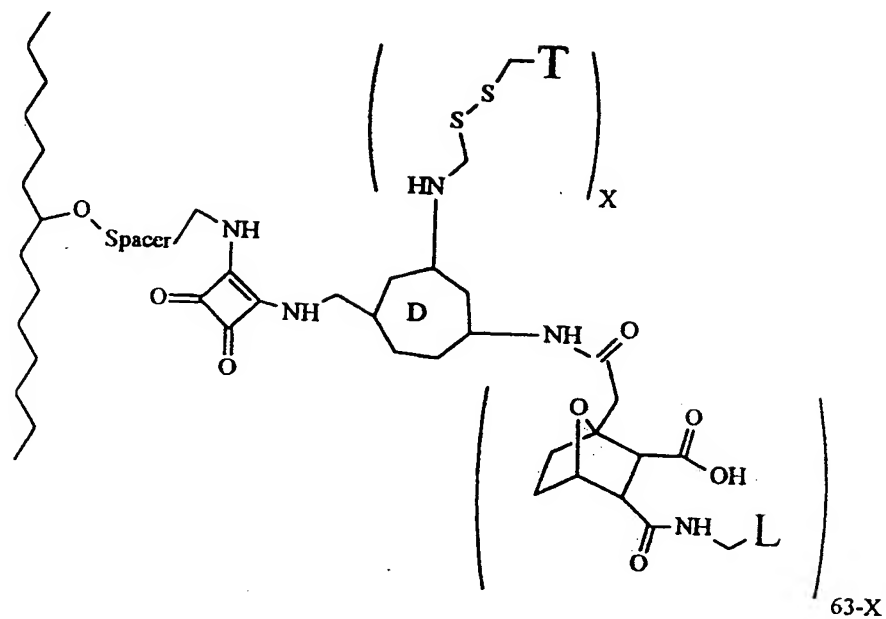
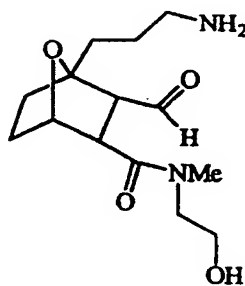


Abbildung 8

VIII



6/6


PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

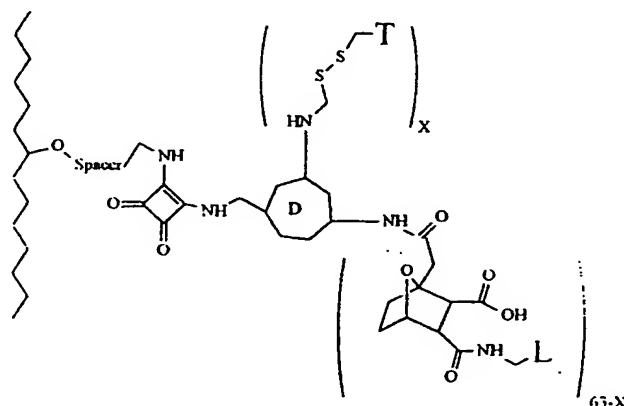
(51) Internationale Patentklassifikation 7: G01N 33/68, 33/566, 30/48	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/13016 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02768 (22) Internationales Anmeldedatum: 31. August 1999 (31.08.99) (30) Prioritätsdaten: 198 39 538.8 31. August 1998 (31.08.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: GLÜSENKAMP, Karl-Heinz [DE/DE]; Elbestrasse 10, D-45768 Marl (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MENGEDE, Christian [DE/DE]; Steinhausenstrasse 8, D-45747 Essen (DE). SEILER, Frank [DE/DE]; Nordschleswigstrasse 59, D-45259 Essen (DE). (74) Anwalt: GEHRKE, Peter, P.; Hölscherstrasse 4, D-45894 Gelsenkirchen (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, DE, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 2. Juni 2000 (02.06.00)	

(54) Title: METHOD FOR PREPARING ARTIFICIAL RECEPTORS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BEREITSTELLUNG VON KÜNSTLICHEN REZEPTOREN

(57) Abstract

The invention relates to a method for preparing artificial receptors on a polymer compound, preferably on a stabilized surface thereof, with binding sites in order to bind biologically or pharmacologically active substances by a) immobilizing template molecules that are biologically or pharmacologically active compounds on the polymer compound, b) coupling reactive functional groups to the polymer compound in order to bond ligands in physiological conditions, c) binding compounds as ligands to the reactive groups, d) preferably stabilizing adjacent compounds that are bonded to the reactive groups for chemical stabilization of the ligands on the polymer compound and e) detaching the template molecules.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bereitstellung von künstlichen Rezeptoren an einer polymeren Verbindung, vorzugsweise an einer stabilisierten Oberfläche derselben, mit Bindungsstellen zur Bindung von biologisch oder pharmakologisch aktiven Substanzen durch a) Immobilisierung von Templat-Molekülen, welche biologisch oder pharmakologisch wirksame Verbindungen sind, an der polymeren Verbindung; b) Koppeln von reaktiven funktionellen Gruppen an die polymere Verbindung zur Bindung von Liganden unter physiologischen Bedingungen; c) Bindung von Verbindungen als Liganden an die reaktiven Gruppen; d) vorzugsweise Stabilisierung der an den reaktiven Gruppen gebundenen benachbarten Verbindungen miteinander zur chemischen Stabilisierung der Liganden an der polymeren Verbindung und; e) Ablösen der Templat-Moleküle.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/02768

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 G01N33/566 G01N30/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 196 27 162 C (FISCHER LUTZ DR) 7 August 1997 (1997-08-07) example 6	1
A	WO 96 41235 A (OREGON STATE ;ADVANCED MICROBIOTICS CORP (US)) 19 December 1996 (1996-12-19) examples 1,2	1
A	DE 43 41 524 A (GLUESENKAMP KARL HEINZ DR ;EBERLE ADAMKIEWICZ GERTRUD DR (DE)) 8 June 1995 (1995-06-08) cited in the application the whole document	1,3,5,6
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 2000

Date of mailing of the international search report

25/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/02768

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 196 24 990 A (GLUESENKAMP KARL HEINZ DR) 8 January 1998 (1998-01-08) cited in the application the whole document ----	1,3,5,6
T	KANEKIYO, YASUMASA ET AL: "Molecular - imprinting' of AMP utilising the polyion complex formation process as detected by a OCM system" J. CHEM. SOC., PERKIN TRANS. 2 (1999), (12), 2719-2722 , XP002130470 the whole document -----	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/02768

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19627162 C	07-08-1997	CA 2259416 A WO 9801466 A EP 0912605 A	15-01-1998 15-01-1998 06-05-1999
WO 9641235 A	19-12-1996	US 5587273 A AU 6170896 A EP 0830639 A JP 11508356 T	24-12-1996 30-12-1996 25-03-1998 21-07-1999
DE 4341524 A	08-06-1995	DE 4499550 C DE 4499550 D WO 9515983 A	03-09-1998 24-07-1997 15-06-1995
DE 19624990 A	08-01-1998	NONE	

PCT/DE 99/02768

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/02768

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 196 24 990 A (GLUESENKAMP KARL HEINZ DR) 8. Januar 1998. (1998-01-08) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1,3,5,6
T	KANEKIYO, YASUMASA ET AL: "' Molecular - imprinting ' of AMP utilising the polyion complex formation process as detected by a QCM system" J. CHEM. SOC., PERKIN TRANS. 2 (1999), (12), 2719-2722 , XP002130470 das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. onales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02768

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19627162 C	07-08-1997	CA 2259416 A	15-01-1998
		WO 9801466 A	15-01-1998
		EP 0912605 A	06-05-1999
WO 9641235 A	19-12-1996	US 5587273 A	24-12-1996
		AU 6170896 A	30-12-1996
		EP 0830639 A	25-03-1998
		JP 11508356 T	21-07-1999
DE 4341524 A	08-06-1995	DE 4499550 C	03-09-1998
		DE 4499550 D	24-07-1997
		WO 9515983 A	15-06-1995
DE 19624990 A	08-01-1998	KEINE	